10: La PCR

La technique de polymérisation en chaîne (en anglais « polymerase chain reaction ») ou PCR, permet d'amplifier des millions de fois un unique fragment d'ADN. Cette méthode est devenue un outil précieux non seulement pour la recherche en biologie moléculaire mais également pour le diagnostique médical, la détermination de microorganismes ou encore la criminologie. L'invention de la PCR revient à Kary Mullis dans les années 80. Il obtint pour cette découverte le Prix Nobel de Chimie en 1993. La découverte d'ADN polymérases thermorésistantes (la Taq polymérase par exemple) isolées de bactéries (*Thermus aquaticus*) vivant dans des sources d'eau chaude a facilité l'utilisation de la PCR et a permis son automatisation.

Thèmes : la PCR, la structure du génome humain, le génotypage, la criminologie, l'ADN, l'électrophorèse.

La PCR

Le principe de la PCR :

Une réaction de PCR nécessite :

1) de l'ADN à amplifier (dénommé template)
2) des amorces (également appelés primers)
3) des desoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
4) une ADN polymérase thermorésistante (la Taq par exemple)
5) du magnésium (Mg^{++}) indispensable au fonctionnement de l'ADN polymérase

Ces 5 ingrédients sont mélangés dans un tube à essai et soumis à différents cycles de températures.

1 cycle de PCR

1ère étape : **la dénaturation** (94°C).
L'ADN template est chauffé à 94°C. Les deux brins de l'ADN se séparent. On parle de dénaturation de l'ADN.

2ème étape : **l'hybridation** (40-65°C).
En descendant la température, les amorces s'apparient (s'hybrident) par complémentarité à leurs séquences cibles sur l'ADN.

3ème étape : **l'élongation** (72°C).
A cette température, la Taq synthétise les brins d'ADN complémentaires en ajoutant des desoxynucléotides triphosphates à la suite des amorces. Le temps d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier et de la vitesse de polymérisation de l'enzyme (la Taq ajoute environ 1000 nucléotides par minute).

Ces trois étapes correspondent à 1 cycle de PCR, à la suite duquel on a doublé le nombre de fragment d'ADN cible initial. Environ une trentaine de cycle sont en principe effectués dans une expérience de PCR classique. Ainsi, après 30 cycles on aura amplifié 2^n fois notre ADN cible.

Schéma des cycles de PCR:

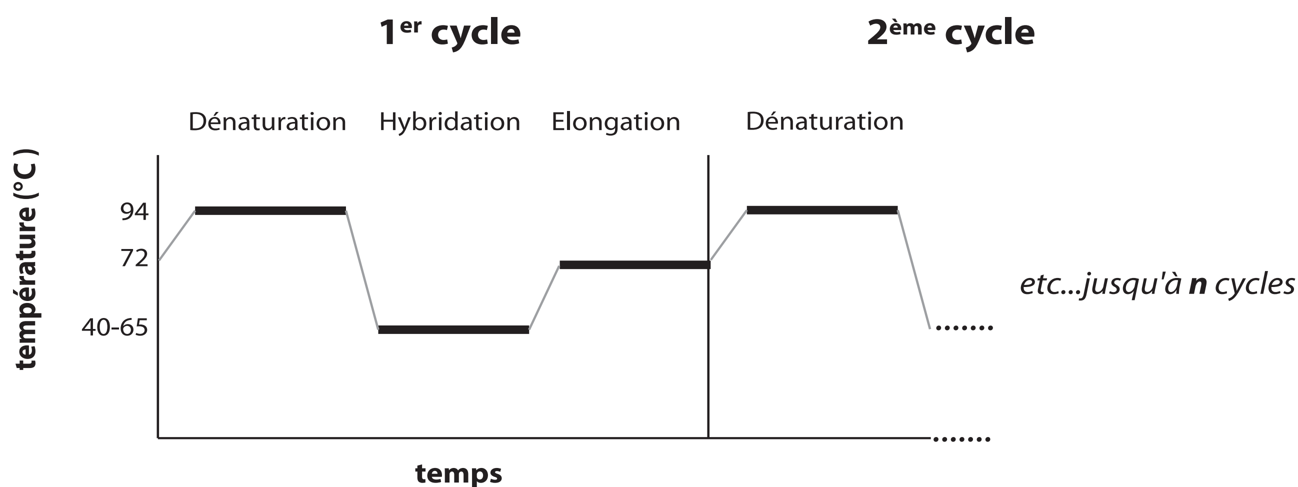


Schéma de l'amplification par PCR:

ADN initial
5'
3'
1er cycle
2ème cycle
etc...

Dénaturation
Hybridation
Elongation

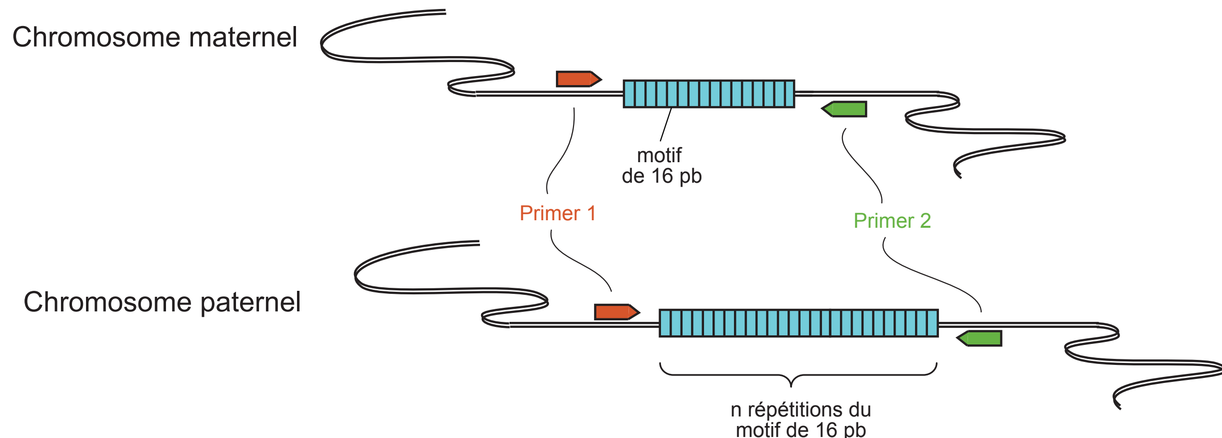
Cycle 1
5' 3'
3' 5'
5' 3'
3' 5'
5' 3'
3' 5'
5' 3'
3' 5'
5' 3'
3' 5'
5' 3'
3' 5'

Cycle 2

Cycle 3
etc...
Cycle n

Les VNTR: L’ADN de très nombreux organismes vivant contient des séquences de nucléotides répétées en tandem les unes à la suite des autres. Ces séquences sont dénommées VNTR (variable numbers of tandem repeats). Le nombre de ces répétitions varie d’un individu à l’autre (de 0 à 300 répétitions) formant ainsi une empreinte génétique utilisée en criminologie, pour des recherches de paternité, ou encore pour étudier la génétique des populations.

Le locus D1S80 est situé sur le chromosome 1. Ce VNTR possède un motif de 16 pb répété de 14 à 41 fois suivant les individus (27 allèles différents). En regardant le nombre de répétitions sur les deux chromosomes 1 (le maternel et le paternel), on obtient ainsi 789 génotypes possibles (27x27=789).



L’EXPERIENCE:

Afin d’éviter toute contamination d’ADN, il est préférable d’utiliser des gants pendant toutes les manipulations.

Cette expérience peut être envisagée sous la forme d’une enquête policière : *Un individu est venu dans le laboratoire de biologie saboter des expériences. Lors de ses méfaits il a laissé un indice : un cheveu. Toute la classe est considérée comme « suspect potentiel » et le but de l’expérience sera de mettre la main sur le coupable*. Le profile (génotype) de chaque élève pour ce locus sera observé sur gel d’agarose et comparé au profil du suspect. Le nombre de répétitions de chaque élève pourra également être déterminé.

Protocole :

La quantité d’ADN peut être critique pour obtenir des bons résultats. Bien qu’il soit possible d’effectuer cette expérience à partir d’un bulbe de cheveux **il est préférable d’utiliser des cellules de la bouche**, plus nombreuses, et obtenues facilement à partir de l’intérieur des joues. Le protocole est décrit ci-dessous:

1) Extraction d’ADN à partir de cellules épithéliales de la bouche:

- Mettre 500 µl d’H2O dans un tube Eppendorf
- Frotter abondamment l’intérieur des joues avec un écouvillon (coton tige) stérile afin d’obtenir un maximum de cellules épithéliales
- Tremper l'écouvillon dans le tube contenant les 500 µl d'H2O. Bien tourner l'écouvillon et le frotter contre les parois du tube
- Bien essorer l'écouvillon en le sortant du tube
- Centrifuger le tube 2 minutes à la vitesse maximum afin de faire tomber les cellules épithéliales.

- A l’aide de la P1000 enlever le surnageant en prenant soin de laisser le culot de cellules au fond du tube. Attention à ne pas aspirer le culot de cellules. Le cas échéant centrifuger à nouveau la salive.
- Ajouter 0.1 ml de solution de NaOH 200 mM sur le culot et le resuspendre en vortexant ou en pipetant à l'aide de la P1000
- Fermer le tube et incuber à 95 °C pendant 10 minutes dans le bloc chauffant
- Vortexer brièvement
- Ajouter 0.1 ml de HCL 200 mM dans votre tube.
- Ajouter 0.1 ml Tris-HCl (pH 8.5) 200 mM dans votre tube.
- Votre préparation d’ADN est prête et peut être stockée au congélateur ou utilisée directement pour la suite de l’expérience.

2) Amplification par PCR

- Préparer le mélange de réactif pour la PCR **juste avant l'emploi**. Ce mélange contient le **2 x Taq mix** (taq polymérases, dNTPs, tampon de polymérisation et tampon de charge rouge), les primers et de l’H2O.

  Pour une classe de 16 élèves par exemple, on compte 16 réactions plus un contrôle négatif ainsi qu'un contrôle positif soit un total de 18 réactions. Afin de faciliter le pipetage et pour avoir assez de matériel en cas d'erreurs nous prévoyons un mélange pour 22 réactions.

	1 réaction	**22 réactions**
2 x Taq mix (rouge)	12.5 µl	275 µl
Primers mix	5 µl	110 µl
H2O	2.5 µl	55 µl

- Ce mélange est préparé dans un tube Eppendorf 1.5 ml juste avant l’emploi. Mélanger en pipetant en haut et en bas délicatement.
- Distribuer ensuite les 20 µl du mélange dans les petits tubes de PCR préalablement marqué **sur le côté** par les initiales des personnes à tester.
- Dans votre petit tube ajouter 5 µl de votre solution d’ADN. Fermer le tube.
- Dans le petit tube PCR destiné au contôle négatif, ajouter 5 µl d’H2O à la place de l’ADN. Fermer le tube.
- Dans le petit tube PCR destiné au contôle positif, ajouter 5 µl d’ADN B2B. Fermer le tube.

- **En suivant les instructions** du mode d'emploi de la machine PCR, mettre les tubes dans la machine et lancer le programme D1S80.
- Le programme dure environ 1h15. Il comporte les cycles suivants:

  94°C, 5 minutes
  94°C, 30 secondes ⎤
  65°C, 30 secondes ⎬ 30 cycles
  72°C, 30 secondes ⎦
  72°C, 5 minutes

- A la fin des cycles de PCR, les tubes peuvent être gardés au congélateur.
- Arrêter la machine PCR en suivant les indications du mode d’emploi.

3) Préparation du gel d'agarose

Le gel d'agarose est une matrice pour séparer les molécules d'ADN selon leur taille dans un champ électrique. Les petits fragments migrent plus vite que les grands, la concentration d'agarose est choisie en fonction de la taille des fragments à séparer. Ici nous allons utiliser un gel à 1.5% d'agarose.

- Peser 1.05 g d'agarose et les mettre dans un Erlenmeyer de 250ml.
- Ajouter 70 ml de tampon d'électrophorèse (TBE 1x).
- Faire bouillir (four à micro-ondes, plaque chauffante ou bec bunsen).
- Laisser refroidir le liquide (à environ 60°C).
- Ajouter 7 µl de SYBR-safe (intercalant qui permettra de visualiser l'ADN) et mélanger en agitant l'Erlenmeyer.
- Verser l'agarose dans la cuve préparée avec un peigne pour former les puits (attention si l'agarose est trop chaud la cuve d'électrophorèse se déforme !)

Les cuves d'électrophorèse possèdent des petits bloques en plexi pour protéger les électrodes. Souvent les cuves sont déformées et les bloques ne rentrent plus. Il suffit donc de couper, après solidification du gel, une petite lamelle d'agarose en haut et en bas du gel pour libérer les électrodes.

- Lorsque le gel est refroidi et solidifié ajouter du tampon d'électrophorèse (TBE 1x) et enlever le peigne.

4) Analyse des génotypes sur gel

- Récupérer vos tubes. Ils contiennent déjà le tampon de charge (rouge) et sont donc prêt à être mis sur gel.

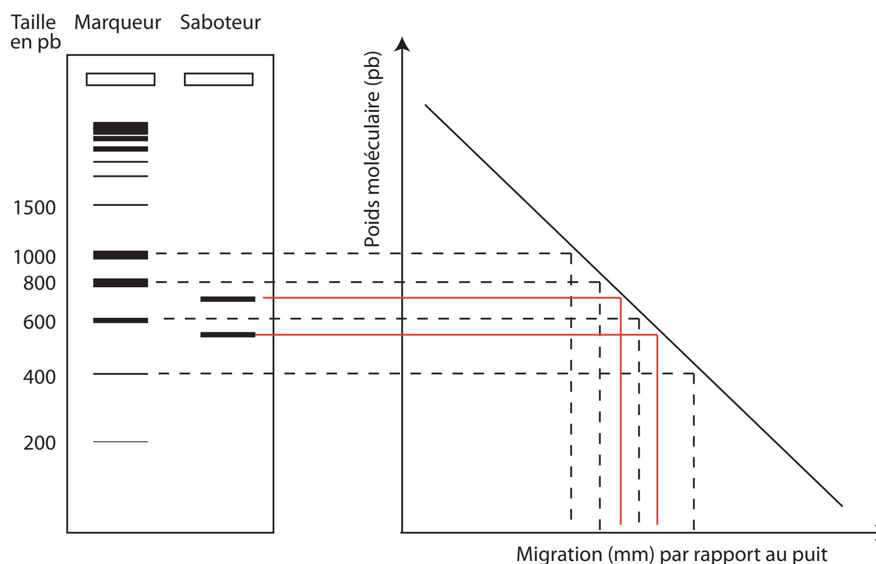
- Charger le gel : 1er puits : 5 µl de marqueur.
  2ème puits : 20 µl du « saboteur ».
  3ème puits et suivants : 20 µl de vos échantillons.
  Avant dernier puits: le contrôle négatif.
  Dernier puits: le contrôle positif.

- Allumer le transformateur et faire migrer à 100V (ampérage maximum).
- Quand le colorant rouge de migration arrive en bas du gel, arrêter le transformateur.
- Prendre le gel et visualiser les bandes sous la lampe bleue.
- Prendre une photo.

5) Résultats et discussions

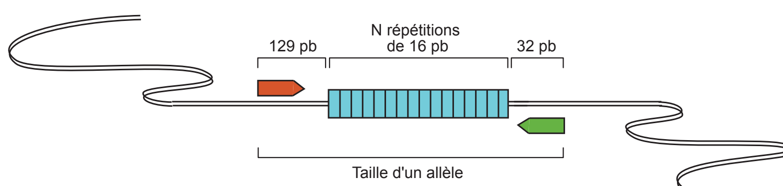
- D'après la taille des fragments obtenus, identifier le saboteur.
- D'après la taille de vos fragments obtenus, déterminer le nombre de répétition pour chacun de vos allèles.
- Le contrôle positif donne 1 bande d'environ 500 pb et une autre d'environ 600 pb.

Pour déterminer précisément la taille des fragments il faut tracer un graphique du log de la taille (en pb) du marqueur en fonction de la distance de migration (en mm) depuis le puits comme dans l'exemple ci-dessous:

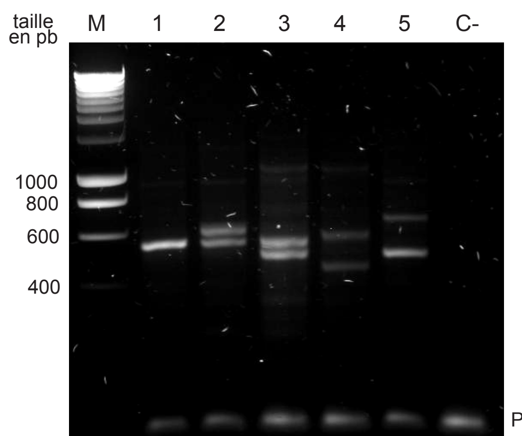


Pour convertir la taille d'un allèle en nombre de répétition utiliser la formule suivante :

$$\text{Taille (en pb)} = 129 + (16)(\text{N répétitions}) + 32$$



Voici un exemple de résultat:



M : marqueur de taille. Lignes 1 à 5 : génotypes de 5 individus. Noter que l'individu 1 est homozygote pour l'allèle D1S80. C- : contrôle négatif (sans ADN), ce contrôle permet de vérifier l'absence de contaminations d'ADN. P : primers.

Matériel:

- Pipettes P20 et embouts stériles
- Pipettes P200 et embouts stériles
- Pipettes P1000 et embouts stériles
- Ecouvillons stériles
- Gants
- Microcentrifugeuse
- Bloc chauffant 95°C
- Tubes à réaction (Eppendorf 1.5ml)
- Tubes PCR (0.2 ml)
- Machine PCR
- H2O stérile
- NaOH (200 mM)
- HCl (200 mM)
- Tris-HCL pH 8.5 (200 mM)
- 2x Taq mix (comprenant la Taq DNA polymérase, les dNTPs et le tampon)
- Primers
- Agarose
- Cuve d'électrophorèse
- Tampon de migration TBE 1x
- SYBR-Safe
- Lampe de détection d'ADN (lumière bleue)
- Marqueur de poids moléculaire

Stockage du matériel:

- Le 2x Taq mix est stocké au congélateur (-20°C), dégelé sur glace (ou brièvement à température ambiante), gardé dans la boîte réfrigérante pendant la manipulation et remis à - 20°C après usage.
- Le SYBR-Safe est stocké au frigo (4°C). Il faut le sortir environ 30 minutes avant de l'utiliser pour que la solution soit bien soluble.
- Le marqueur d'ADN, l'ADN B2B (contrôle positif), les primers sont stockés au congélateur (-20°C), dégelé à température ambiante et remis à -20°C après usage.
- Le reste du matériel peut être gardé à température ambiante.

Ce protocole est une adaptation de l'article suivant : **D.S. Jackson, C. S. Abbey, and D. Nugent.** 2006. DNA profiling of the D1S80 locus: a forensic analysis for undergraduate biochemistry laboratory. J. Chem. Edu. **83:**774-776.